

516, 825

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
18 de Diciembre de 2003 (18.12.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 03/103695 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 35/78, A61P 15/10, 43/00
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES03/00272
- (22) Fecha de presentación internacional:
5 de Junio de 2003 (05.06.2003)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P 200201345 6 de Junio de 2002 (06.06.2002) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
ESPECIALIDADES FARMACÉUTICAS CENTRUM,
S.A. [ES/ES]; Sagitario, 14, 03006 ALICANTE (ES).
- (72) Inventor; e
- (75) Inventor/Solicitante (para US solamente): QUIN-
TANILLA ALMAGRO, Eliseo [ES/ES]; Sagitario, 14,
03006 ALICANTE (ES).
- (74) Mandatario: GÓMEZ-ACEBO, Ignacio; PROPI, S.L.,
Jorge Juan, 19 - 3º, 28001 MADRID (ES).
- (81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
— con informe de búsqueda internacional
- Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: NOVEL THERAPEUTIC USE OF POLYPODIUM EXTRACTS

(54) Título: NUEVO USO TERAPÉUTICO DE LOS EXTRACTOS DE POLYPODIUM

(57) Abstract: The invention relates to a novel use of extracts of the genus Polypodiaceae for the treatment of fibrotic diseases, diseases caused by an overexpression of the components of the extracellular matrix or by an overexpression of Transforming Growth Factor (TFG- β), e.g. scleroderma, pulmonary fibrosis, atherosclerosis, medullary fibrosis, hepatic fibrosis, pancreatic fibrosis, renal fibrosis, cardiac fibrosis, Dupuytren's disease and, in particular, Peyronie's disease. The invention also relates to the inhibition of the components of the extracellular matrix in vitro and the reduction of the fibrosis in the tunica albuginea of the penis and the size of the collagen plate in patients with Peyronie's disease using Polypodium extracts. In a preferred mode, the Polypodium extracts are obtained by extraction with a polar solvent from the rhizomes of Polypodium leucotomos.

(57) Resumen: Se describe un nuevo uso de los extractos del género de las Polypodaceas para el tratamiento de las patologías fibróticas, patologías producidas por una sobreexpresión de los componentes de la matriz extracelular y por una sobre expresión del Factor Transformante de Crecimiento (TFG- β); por ejemplo, esclerodermia, fibrosis pulmonar, aterosclerosis, fibrosis medular, fibrosis hepática, fibrosis pancreática, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, enfermedad de Dupuytren y, especialmente, enfermedad de La Peyronie; se describe la inhibición de los componentes de la matriz extracelular in vitro, reducción de las fibrosis de la túnica albugínea del pene y tamaño de la placa de colágeno en pacientes con la enfermedad de Peyronie por los extractos de Polypodium; en un modo preferente los extractos de Polypodium son obtenibles por extracción con un disolvente polar a partir de los rizomas del Polypodium leucotomos.

BEST AVAILABLE COPY

WO 03/103695 A1

NUEVO USO TERAPÉUTICO DE LOS EXTRACTOS DE POLYPODIUM.

Campo técnico de la invención

5 La presente invención describe un nuevo uso terapéutico de los extractos de Polypodium, concretamente, para el tratamiento de las fibrosis.

Antecedentes de la invención

10 Las fibrosis tisulares son patologías crónicas caracterizadas por una sobreproducción de los componentes de la matriz extracelular (ECM), principalmente colágeno y fibronectina, y la proliferación de los fibroblastos.

Recientemente, se ha descubierto que el Factor Transformante de Crecimiento (TGF- β) está implicado en todos procesos fibróticos e induce la
15 expresión de las proteínas de la matriz extracelular (ECM), independientemente de su patogenia. A título de ejemplo, se pueden nombrar las siguientes enfermedades fibróticas: esclerodermia, fibrosis hepática, fibrosis medular, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, fibrosis cardíaca, fibrosis pancreática, fibrosis renal, enfermedad de Dupuytren o enfermedad de La
20 Peyronie.

Por lo que respecta a la enfermedad de La Peyronie, es una enfermedad con una epidemiología, historia y etiología ampliamente desconocidas. Entre los factores etiológicos encontrados se pueden citar factores genéticos,
25 traumáticos, hipertensión arterial y/o idopáticos.

En el ámbito clínico, los enfermos presentan una fibrosis en la túnica albugínea del pene que producen unas induraciones o placas en el pene muy

dolorosas en la fase temprana de su evolución. Las placas durante la erección provocan una incurvatura del pene que en grados avanzados dificulta o impide la actividad sexual. En ciertas ocasiones, el cuadro clínico se acompaña de pérdida de rigidez en la erección.

5

Al igual que en otras fibrosis, se ha descrito que el Factor Transformante del Crecimiento (TFG- β) está implicado en la etiopatogenia de la enfermedad de La Peyronie y los enfermos tienen aumentada esta proteína. Además, es no es extraño que la enfermedad de La Peyronie esté asociada con
10 otras fibrosis, principalmente con la enfermedad de Dupuytren o enfermedad de Paget.

La búsqueda de nuevos tratamientos para el tratamiento de las fibrosis
15 está enfocada hacia la búsqueda de productos capaces de inhibir la sobreproducción del Factor de Crecimiento Transformante (TFG- β) que produciría una inhibición en la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular. Sin embargo, no hay una correlación clara entre la reducción del TGF- β en los estudios *in vitro* y en los modelos con animales, con los
20 resultados obtenidos *in vivo* respecto a la mejoría clínica o reducción de las placas de colágeno.

El-Sakka et al. *J. Uro.* 1999 Jun;161(16):1980-3 describen que la colchicina disminuye la expresión de TFG- β en ratas que desarrollaron la
25 enfermedad de La Peyronie por inyección en el pene de las ratas del TGF- β .

Sin embargo, Reinhart et al. *Dtsch Z Verdau Stoffwechselkr* 1986;46(5):257-75 describen que el tratamiento con colchicina sobre pacientes

con fibrosis hepática produce con la misma frecuencia, una mejoría, un empeoramiento o ningún cambio en los grados de fibrosis.

- Respecto a la enfermedad de La Peyronie, Kadioglu et al. *Int. J. Impot. Res.* 2000 Jun; 12(3):169-75 describen que, sobre una muestra de 60 pacientes afectados por la enfermedad de La Peyronie y tratados durante 10 meses con colchicina, la incurvación del pene mejoró en el 30% de los casos, permaneció igual en el 48% de los casos y empeoró en el 22% de los casos.
- 10 Uno de los tratamientos utilizados actualmente, es el uso de tamoxifeno (*Ralph et al. The treatment of Peyronie's disease with Tamoxifeno. Br J Urol.* 1992,70: 684-651) basándose en su actividad *in vitro* reguladora de la secreción de TGF- β . Sin embargo, su eficacia clínica es reducida. Así, Teloken C et al *Tamoxifen versus placebo in the treatment of Peyronie's*
- 15 *diseases J Urol.* 1999 Dec;162(6):2003-5, en un estudio clínico comparativo entre Tamoxifeno versus placebo los resultados fueron similares.

Otros métodos para reducir la placa incluyen la inyección vía intracavernosa de diversos agentes farmacológicos, a título de

20 ejemplo:interferón α 2b, verapamilo o corticoides. Esta vía de administración es dolorosa para el paciente y la administración de la droga la debe realizar una persona cualificada. La administración de estos agentes puede producir efectos secundarios: el interferón gamma produce fiebre, malestar y mialgia; los corticoides intraplaca producen gangrena; el tamoxifeno oralmente

25 produce disminución de la libido y disminución del eyaculado.

Los extractos de Polypodium han sido descritos en el estado de la técnica con diferentes actividades farmacológicas. Las patentes EP-0503.208,

ES-2.088.770, EP 1.172.111 y los documentos citados en la patente europea EP 1.172.111 describen diferentes actividades farmacológicas de los extractos de Polypodium. Las actividades terapéuticas descritas en el estado de la técnica se pueden resumir en: actividad inmunológica y reguladora de
5 diferentes poblaciones de citocinas; regulación de la expresión de las moléculas de adhesión; actividad en las enfermedades neurodegenerativas; actividad anti-inflamatoria y actividad colagenopoyética.

Así, los documentos más cercanos a la invención son los que describen
10 la actividad colagenopoyética de los extractos de Polypodium y su aplicación en las patologías con un defecto de colágeno.

EP-503.208 describe la actividad inumoduladora de los extractos de Polypodium y su actividad en la estimulación de los fibroblastos para
15 sintetizar precolágeno.

FR 2.479.690 describe, también, el uso de los extractos de las Polypodaceas en el tratamiento de las enfermedades del aparato osteomotor que cursan un déficit de colágeno. De esta forma se sugiere que los extractos
20 de Polypodium aumentan la síntesis de colágeno y sintetizan un colágeno más resistente.

Objeto de la invención

25

El problema que resuelve la presente invención es conseguir un tratamiento farmacológico eficaz para las fibrosis o enfermedades fibróticas, tales como esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, aterosclerosis,

fibrosis pancreática, fibrosis cardíaca, fibrosis hepática, fibrosis medular, enfermedad de Dupuytren y, especialmente, la enfermedad de la Peyronie, estando caracterizadas estas patologías por un sobreproducción de los componentes de la membrana extracelular (ECM).

5

La solución encontrada por los inventores es el uso de Polypodium, como se describe en la reivindicación 1.

Los inventores han encontrado que, los extractos de Polypodium
10 inhiben *in vitro* de forma dosis dependiente la síntesis de colágeno y fibronectina en fibroblastos humanos. Esta capacidad reguladora de los extractos de Polypodium se ha mostrado también *in vivo*, reduciéndose la placa de colágeno en los pacientes que sufren la enfermedad de La Peyronie, fibrosis de la túnica albugínea del pene.

15

Otro problema resuelto por los extractos de Polypodium es la reducción de la expresión del Factor Transformante de Crecimiento (TGF- β), proteína involucrada en todas las patologías fibróticas, como se describe en la reivindicación 2. Además, esta reducción de la expresión del TGF- β es más
20 significativa *in vivo* que la producida por el tamoxifeno, fármaco de referencia por su actividad reguladora del TGF- β .

Como es conocido por el experto, la administración de extractos de Polypodium no produce ningún efecto secundario ni toxicológico, evitándose
25 de esta forma los efectos adversos producidos con las terapias anticitocinas.

En un modo particular, otro problema que resuelve la administración de extractos de Polypodium, es obtener una mejora en los parámetros clínicos

relacionados con la enfermedad de la Peyronie, es decir, tras la administración por vía oral de los extractos de Polypodium se reduce la placa fibrótica de la túnica albugínea del pene, se reduce el dolor durante el coito, se reduce la incurvatura del pene y se produce una mejora psicológica de los pacientes, como se describe en la reivindicación 3. Los resultados clínicos obtenidos en los pacientes tratados con los extractos de Polypodium son estadísticamente mejores que los pacientes tratados con otros fármacos.

La vía oral, según la reivindicación 9, resuelve los problemas relacionados por la administración por vía intracavernosa: la inyección por vía intracavernosa la debe realizar una persona cualificada y es una vía de administración dolorosa.

En un modo particular, los extractos de Polypodium son obtenibles mediante extracción con disolvente polar, constante dieléctrica mayor de 20. Más concretamente, los extractos de Polypodium son obtenibles mediante extracción con agua, y más concretamente, mediante la extracción con agua de los rizomas del Polypodium leucotomos, según se describe en las reivindicaciones 4,5,6 y 7.

20

Con el propósito de describir los extractos descritos en la invención paramétricamente, la reivindicación 8 describe las especies químicas presentes dichos extractos.

25 Descripción detallada de la invención

Los extractos de *Polypodium* son obtenibles mediante extracción con un disolvente polar, significando disolvente polar un disolvente una constante

dieléctrica (ϵ) mayor a 20. En la tabla siguiente se indican algunos valores de constante dieléctricas de los disolventes a 20°C según Handbook of Chemistry and Physics, 54^a Edition.1973

5	Disolvente	Constante dieléctrica (ϵ)
	Agua	80
	Metanol	32
	Etanol	24
	Etilenglicol	37

10

En un modo preferente realización, los extractos de Polypodium son obtenidos por extracción con agua y evaporación del disolvente.

Alternativamente, se pueden utilizar otras operaciones conocidas para el experto en la materia y descritas en el estado de la técnica para la purificación de los extractos de Polypodium, o mejorar el rendimiento de la extracción. Por consiguiente, estas operaciones no aportarían ninguna ventaja adicional al extracto. Entre estas operaciones se pueden citar: optimización de las condiciones del secado de la planta; combinación de diferentes disolventes; desengrasado del material vegetal; adición de agentes conservantes; adición de agentes antimicrobianos; adición de cargas para facilitar la conservación y mejorar la manipulación; extracción mediante fluidos en estado supercrítico; optimización de la época de recolección del material vegetal; purificación mediante cromatografía; purificación mediante adsorción con carbón activo u otros.

25

El material vegetal descrito en la invención fue recolectado en la región de los Montes Mataque en Guatemala, con la consiguiente autorización de las autoridades del país.

- 5 La clasificación taxonómica de las especies vegetal depende del autor, por lo tanto, existen diferentes nomenclaturas dependiendo de la clasificación utilizada.

- La clasificación taxonómica del material vegetal descrito en la presente
10 invención se detalla a continuación:

Nombre científico: *Phlebodium aureum* (Linnaeus)

Subgénero: *Phlebodium*

Género: *Polypodium*

Familia: *Polypodiaceae*

- 15 Además, existen otras sinonimias aceptadas tales como *Polypodium aureum* (Linnaeus) ó *Polypodium leucotomos* (Poiret) y otras variedades: *Polypodium aerolatum*, *Phlebotiu aerolatum*, *Polypodium aureum* var. *Aerolatum* ó *Pleopeltis aurea*.

- 20 Por lo tanto, el término *Polypodium* se refiere a los helechos comprendidos en el género *Polypodium*.

- En un modo preferente de la invención, los rizomas de *Polypodium leucotomos* (Poiret) se secan y se extractan con agua en una relación rizoma/
25 disolvente (1:10). Con el fin de disminuir la carga bacteriana, el extracto se filtra a través de membrana. El disolvente se evapora a presión reducida hasta obtener una humedad residual del 25% aproximadamente. A los extractos resultantes se le añaden cargas (almidón,

lactosa y estearato magnésico) para facilitar la manipulación y evitar la contaminación microbiana. El extracto estabilizado se encapsula en dosis unitarias equivalentes a 120 mg de extracto acuoso seco.

- 5 El análisis cromatográfico de los extractos(Columna rellena de Octadecilsilano 5 micras; fase móvil(ácido fosfórico 3%: agua: acetonitrilo/ 25:72:3);detección a 210 nm) muestra la presencia en los extractos de ácido quínico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido málico y ácido cítrico. De esta forma, estos compuestos se utilizan como marcadores del extracto para fines
- 10 analíticos.

Los cultivos de fibroblastos de piel humana son un buen modelo para el estudio del efecto de los fármacos en las enfermedades fibróticas, es decir, las patologías que cursan una sobreproducción de los componentes de la matriz

15 extracelular.

Los extractos de Polypodium han inhibido la síntesis de colágeno de manera dosis dependiente tras la incubación de fibroblastos humanos con 1,10,50,100,500 µg/ml de extracto de Polypodium en presencia de prolina

20 triada(³ H-prolina)a 37 ° C durante 24 horas y medida de la prolina triada incorporada. Los extractos de Polypodium inhibieron un 40%, para una concentración de 50 µg/ml, la síntesis de colágeno frente a los controles.

Los extractos de Polypodium han inhibido también la síntesis de la

25 fibronectina, tanto los extractos de hoja como de rizoma, *in vitro*. Después de la incubación de los fibroblastos en presencia de los extractos de Polypodium y medida por inmunoensayo, los extractos de Polypodium inhibieron de forma dosis dependiente(20 –1000 µg/ml)la síntesis de fibronectina al 40%.

A parte de la actividad inhibidora de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (ECM) *in vitro*; los extractos de Polypodium han mostrado esta actividad *in vivo*. Después de la administración *in vivo* a 5 pacientes con la enfermedad de La Peyronie, se ha reducido el tamaño de la placa de colágeno del pene y también se ha reducido la expresión del TFG- β , proteína sobreexpresada en todas las fibrosis.

En un estudio clínico sobre 34 pacientes durante seis meses de 10 tratamiento, los pacientes tratados con el Extracto de Polypodium mostraron una mejor evolución, tanto clínica como psicológica, que los pacientes tratados con Tamoxifeno. En todos los parámetros analizados la mejoría es estadísticamente significativa.

15 Los resultados obtenidos se detallan a continuación:

	GRUPO P Polypodium			GRUPO T Tamoxifeno		
Nº Pacientes	19			15		
Parámetros analizados	Mejor	Igual	Peor	Mejor	Igual	Peor
Placa	5(26%)	14(74%)	0	4(27%)	8(53%)	3(20%)
Dolor	13(68%)	6(32%)	0	10(66%)	5(33%)	0
Incurvación pene	13(68%)	5(26%)	1(5%)	7(46%)	5(33%)	3(20%)
Dificultad coital	8(42%)	6(33%)	5(25%)	6(40%)	3(20%)	6(40%)

Los resultados obtenidos con los extractos de Polypodium son mejores, también, que los resultados descritos por Kadioglu et al *Int. J. Impot. Res.*

2000 Jun; 12(3):169-75. Estos autores describen que, sobre una muestra de 60 pacientes afectados por la enfermedad de La Peyronie y tratados durante 10 meses con colchicina, la incurvación del pene mejoró en el 30% de los casos, permaneció igual en el 48% de los casos y empeoró en el 22% de los casos.

5

Los pacientes del grupo P fueron tratados con 720 mg de extracto de Polypodium obtenido según ha descrito anteriormente cada 8 horas vía oral.

10 Los pacientes del grupo T fueron tratados con 20 mg de Tamoxifeno cada 24 horas vía oral.

La edad de los pacientes estudiados estaba en el mismo rango.

15 El tamaño de la placa se determinó por un examen físico y mediante ecografía de pene.

La incurvatura del pene se determinó fotográficamente.

20 En los pacientes tratados con extractos de Polypodium la producción de TGF- β decreció un 22% tras el tratamiento respecto a los valores iniciales, mientras que en los pacientes tratados con Tamoxifeno la producción de TGF- β decreció un 5%.

25 Igualmente se produjo una disminución del 17% de la interleucina 10 (IL-10) del grupo tratado con los extractos de Polypodium frente a una disminución del 79% de la IL-10 en el grupo tratado con tamoxifeno

Después del tratamiento, el 67% de los pacientes tratados con los extractos de Polypodium estaba satisfecho con el tratamiento frente al 45% del grupo tratado con Tamoxifeno.

5 Explicación de las figuras

La figura 1 describe efecto de los extractos de rizoma de Polypodium sobre la inhibición de la síntesis de colágeno. Se indica la media de 4 experimentos paralelos y la desviación estándar.

10

La figura 2 describe efecto de los extractos de rizoma de Polypodium sobre la inhibición de la síntesis de fibrotecnina. Se indica la media de 3 experimentos paralelos y la desviación estándar.

15 La figura 3 describe efecto de los extractos de hoja de Polypodium sobre la inhibición de la síntesis de fibrotecnina. Se indica la media de 3 experimentos paralelos y la desviación estándar.

20 Ejemplo 1. Efecto de los extractos de Polypodium sobre los componentes de la matriz extracelular

Extractos de Polypodium. Los extractos de Polypodium fueron obtenidos por extracción en agua durante 48 horas, filtración por membrana, evaporación del
25 disolvente a presión reducida, redisolución en suero fisiológico y liofilización. Los extractos se disolvieron en PBS y se usaron inmediatamente después de su reconstitución.

Medios de cultivo. Los fibroblastos se obtuvieron de material quirúrgico. Las muestras de piel se preincubaron durante 2 horas a 4 ° C en medio de cultivo RPMI 1640 con una cantidad doble (2%) de penicilina/estreptomicina. Posteriormente, los tejidos grasos se eliminaron, la piel se cortó en pequeños trozos y se fijó a placas de cultivo humedecidas con suero fetal de ternero (FCS). Los trozos de piel se incubaron a 37 ° C en atmósfera de dióxido de carbono al 5% en RPMI 1964 con un 10% de FCS y un 1% de penicilina/estreptomicina. El medio se renovó 2 vez veces por semana. Los fibroblastos se tripsinizaron (Tripsina/EDTA: 0.05%/0.02%) y se subcultivaron para los experimentos. Se usaron solamente las células entre el cuarto al decimoprimer pase(4°-14°).

Síntesis de colágeno. Los fibroblastos de piel humana sana se cultivaron en microplacas para tejidos. Cada pocillo se inoculó con 10.000 células en 100 µl del medio RPMI suplementado con FCS(10%) y L-ácido ascórbico (50 µg/ml). Después de 24 horas de incubación en una atmósfera al 5% en dióxido de carbono el medio de cultivo se remplazó por 100 µl de medio fresco conteniendo las diferentes concentraciones ensayadas (1-1000 µg/ml de extractos de Polypodium) y 1µCi ³H-prolina. Después de una posterior incubación durante 24 horas, se extrajo el colágeno de cada pocillo por la adición de 100 µl de ácido acético frío(1M) con pepsina al 1% y se guardó durante toda la noche a 4 ° C. Todos los pasos siguientes se realizaron a 4 ° C. El contenido de los pocillos se transvasó a tubos de 3 ml de polipropileno a los cuales se les añadió 800 µl de ácido acético(0.5M) que contenía una sal soluble de colágeno de piel de rata que actuaba como diluyente. Los tubos se centrifugaron a 4.000 g durante 20 minutos. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios y el precipitado se decartó. El colágeno se precipitó del sobrenadante por la adición de 250 µl de cloruro sódico en ácido acético 0.5M

(25%) a cada tubo. Después de 2 horas los tubos se centrifugaron a 4000 g durante 30 minutos y los precipitados se redisolviéron en 300 µl de NaCl 0.15 en Tris-HCl 0.05 M, pH 7.5. El colágeno se precipitó por la adición de 2 ml de cloruro sódico 4.5 M en el mismo tampón. Después de 2 horas, los tubos se
5 centrifugaron a 4000 g durante 30 minutos, se descartaron los sobrenadantes y el colágeno precipitado se lavó con 2 ml de etanol al 2% y se centrífugo a 4000 g durante 30 minutos. Finalmente, cada precipitado se disolvió en 250 µl de ácido acético 0.5 M y se llevó a viales de centelleo que contenían 5-10 ml de una solución de centello. Se midió la radiactividad en un contador de
10 centelleo líquido con estándar externo según el método descrito en Webster and Harvey, *Analytical Biochemistry* 96,220-224,1979.

Síntesis de Fibrotecnica. Los fibroblastos se cultivaron en microplacas con una densidad inicial de 20.000 células por mililitro con medio RPMI sin FCS.
15 Después de 24 horas a 37 °C y en una atmósfera de dióxido de carbono al 5%, el medio de cultivo se renovó y las células se cultivaron durante 48 horas a 37 °C con las diferentes concentraciones de los extractos (1 –1000 µg/ml). Las células posteriormente se lavaron tres veces con PBS que contenía seroalbúmina bovina (BSA) al 1% y polisorbato 20 (Tween 20). Las células
20 se fijaron con una disolución de metanol/acetona (v/v:1/1) durante 30 minutos, las células se lavaron tres veces, como se ha descrito anteriormente, y se incubaron con un anticuerpo monoclonal de ratón antifibrotecnina (Sigma F-7384). Después del lavado, las células se incubaron con un anticuerpo monoclonal de cabra antiratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma A-
25 2179) durante 1 hora a 37° C. Las células se lavaron de nuevo tres veces y se incubaron con fosfato de p-nitrofenilo (1 mg/ml) durante 15 minutos en la oscuridad. Posteriormente, las microplacas se centrifugaron a 200 g durante 5

minutos y 100 μ l del sobrenadante se transfirió a una nueva microplaca. Se midió en un lector ELISA a 405 nm.

Resultados

5

1. Efectos del extracto de rizoma de Polypodium sobre la inhibición de la síntesis del colágeno.

Sobre 4 experimentos paralelos los datos obtenidos son:

10

	Concentración	% de incorporación	% de inhibición
	Control	100%	0%
	1 μ g/ml	116%	-16%
15	10 μ g/ml	84%	16%
	50 μ g/ml	58%	42%
	100 μ g/ml	60%	40%
	500 μ g/ml	53%	47%
	10 ³ μ g/ml	64%	36%

20

En la figura 1 se ilustran estos resultados.

2. Efectos del extracto de rizoma de Polypodium en la inhibición de la síntesis de la fibronectina.

25

Sobre 3 experimentos paralelos los resultados obtenidos fueron:

	Concentración	% de incorporación	% de inhibición
	Control	100%	0%
	1 µg/ml	95%	5%
	10 µg/ml	98%	2%
5	20 µg/ml	95%	5%
	50 µg/ml	87%	13%
	500 µg/ml	76%	24%
	10 ³ µg/ml	60%	40%

10 En la figura 2 se ilustran estos resultados.

3. Efectos del extracto de hoja de Polypodium en la inhibición de la síntesis de la fibronectina.

15 Sobre 3 experimentos paralelos los resultados obtenidos fueron:

	Concentración	% de incorporación	% de inhibición
	Control	100%	0%
	1 µg/ml	105%	-5%
20	10 µg/ml	86%	14%
	20 µg/ml	85%	15%
	50 µg/ml	82%	18%
	500 µg/ml	55%	45%
	10 ³ µg/ml	40%	60%

25

En la figura 3 se ilustran estos resultados.

REIVINDICACIONES

1. Uso de los extractos de *Polypodium* para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de las patologías fibróticas, tales como, esclerodermia, fibrosis pulmonar, aterosclerosis, fibrosis medular, fibrosis hepática, fibrosis pancreática, fibrosis renal, fibrosis cardiaca, enfermedad de Dupuytren o enfermedad de La Peyronie.
5
2. Uso de los extractos de *Polypodium* según la reivindicación 1 caracterizado porque disminuyen la expresión del Factor Transformante del Crecimiento beta (TGF- β).
10
15
3. Uso de los extractos de *Polypodium* según la cualquiera de las reivindicaciones 1-2 caracterizado porque, al menos, reducen la incurvatura del pene, reducen el tamaño de placas del pene, reducen el dolor durante el coito o producen una mejora psicológica, en los individuos que padecen la enfermedad de La Peyronie.
20
4. Uso de los extractos según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 donde la composición farmacéutica
25

comprende un extracto de Polypodium obtenible por extracción con disolvente con una polaridad mayor de 20.

- 5 5. Uso de los extractos según la reivindicación 4
caracterizado porque la composición farmacéutica
comprende un extracto obtenible por extracción con
medios para solubilizar los compuestos solubles en agua.
- 10 6. Uso de los extractos según cualquiera de las
reivindicaciones anteriores caracterizados por el extracto es
obtenido a partir de los rizomas.
- 15 7. Uso los extractos según la reivindicación 6 donde la
especie utilizada es *Polypodium leucotomos* (Poiret).
- 20 8. Uso de los extractos según cualquiera de las
reivindicaciones anteriores caracterizados porque los
extractos comprenden al menos ácido láctico, ácido
fumárico, ácido quínico, ácido cítrico o ácido málico.
- 25 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores
caracterizado porque la vía de administración es oral.

1/3

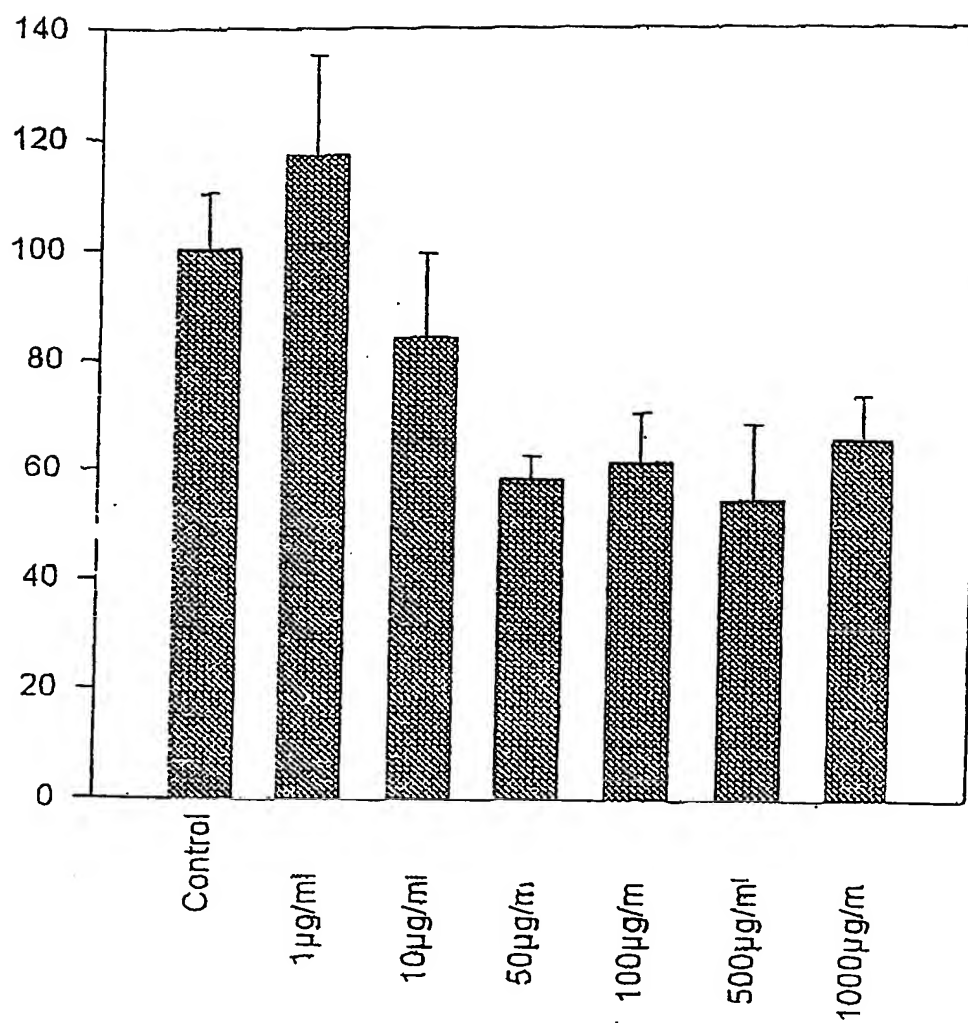


Figura 1

2/3

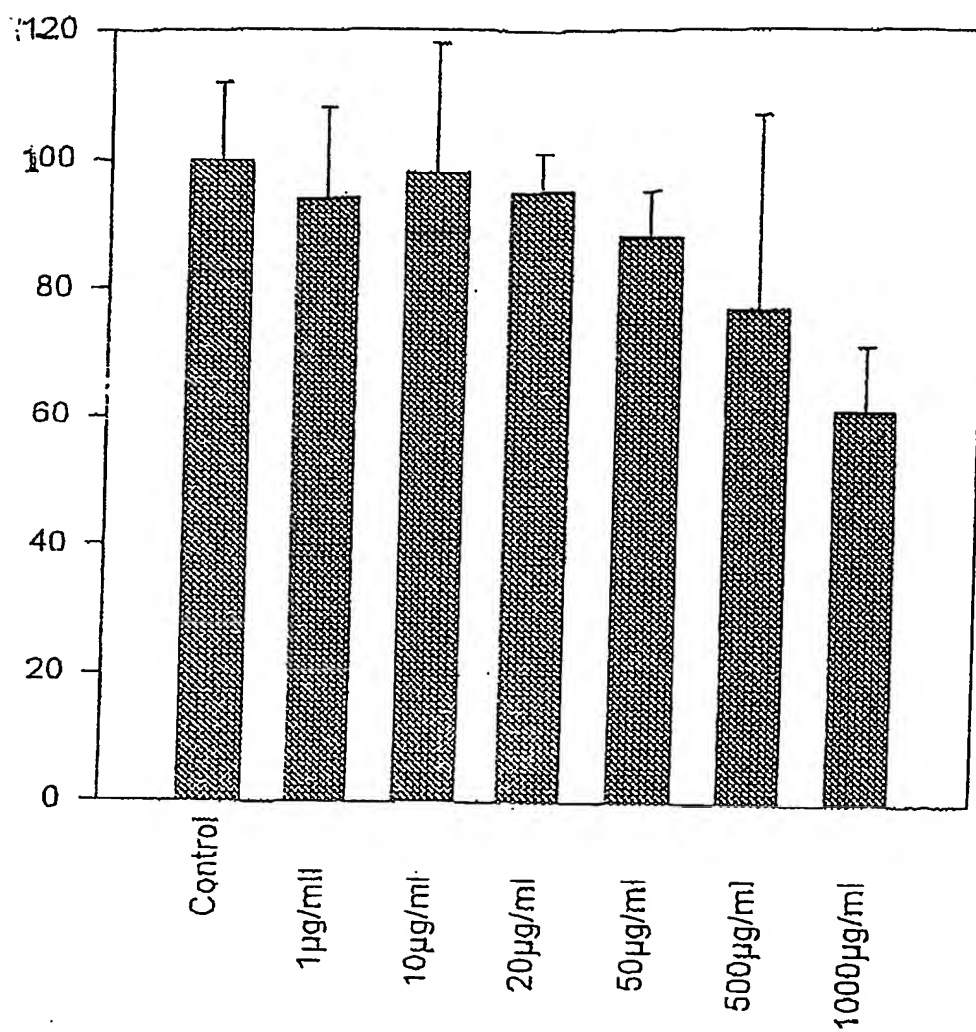


Figura 2

3/3

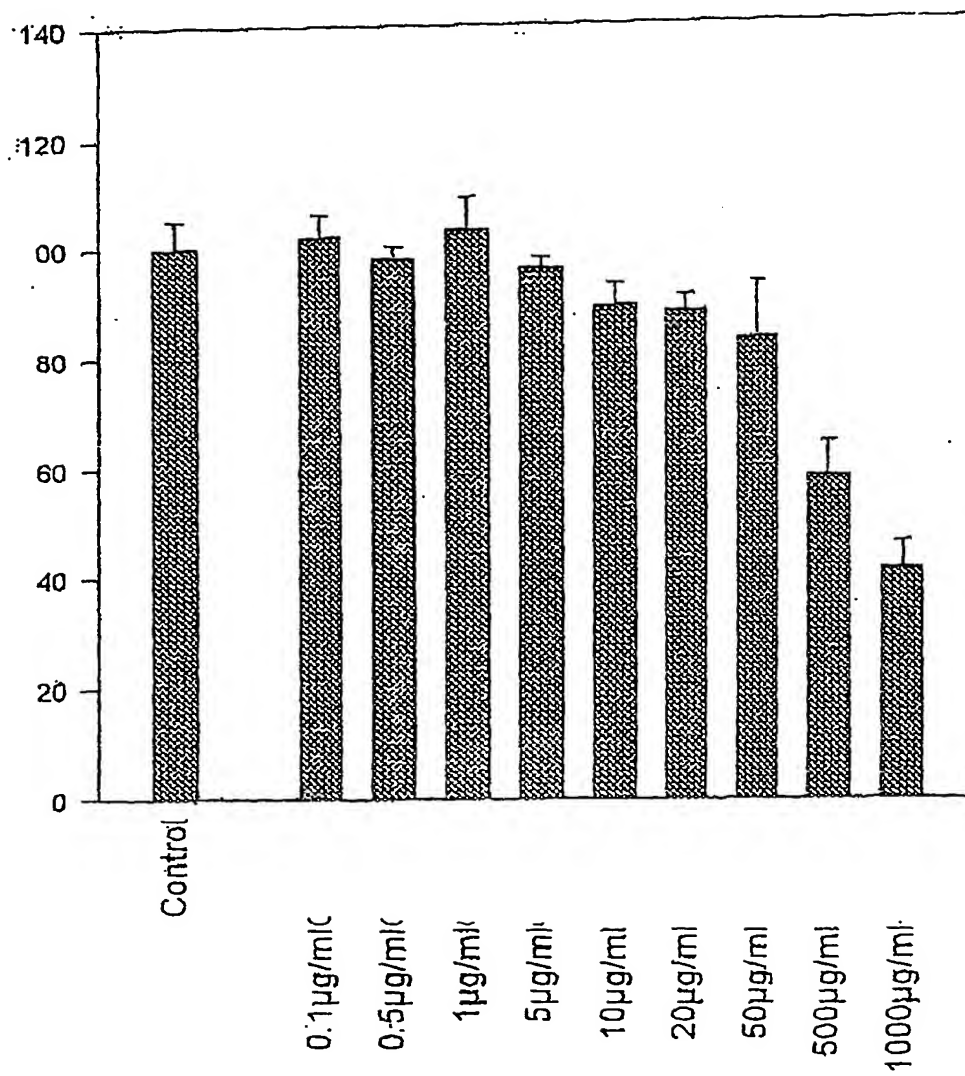


Figura 3

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K 35/78, A61P 15/10, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, HCAPLUS, EMBASE, SCISEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0503208 A1 (MARACUYAMA INTERNATIONAL, S.A.) 16.09.1992 page 2, line 45 - page 3, line 18	
A	WO 0007587 A1 (EASTERLING, W. J.) 17.02.2000, the whole document	
A	CORRALES PADILLA, H. et al. "A new agent (Hydrophilic fraction of Polypodium leucotomos) for management of psoriasis". International Journal of Dermatology, 1974. Vol. 13, pages 276-282.	
A	TUOMINEN, M. et al. "Effects of Calaguala and an active principle, Adenosine, on platelet activating factor". Planta Médica, 1992. Vol. 58, pages 306-310.	
A	BR 9801985 A (RIBEIRO SANTANA, C.A.) 08.02.2000	
A	US 4338300 A (GELBARD) 06.07.1982	
A	US 6022539 A (WEGMAN) 08.02.2000	
A	US 5911994 A (REINHARD et al.) 15.06.1999	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 august 2003 (11.08.2003)

Date of mailing of the international search report

05 sep 2003 (05.09.03)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/ES 03/ 00272

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0503208 A1	16.09.1992	NONE	
WO 0007587 A1	17.02.2000	US 6031005 A AU 5105599 A NO200100593 A EP 1105113 A1 US2001047037 A1 US 6353028 B2	29.02.2000 28.02.2000 02.04.2001 13.06.2001 29.11.2001 05.03.2002
BR 9801985 A	08.02.2000	NONE	
US 4338300 A	06.07.1982	NONE	
US 6022539 A	08.02.2000	DK200000792 A DE10027521 A1 FR 2794369 A1 AU200035329 A CA 2308842 A1 GB 2352173 A NO200002686 A SE200001914 A	04.12.2000 07.12.2000 08.12.2000 07.12.2000 03.12.2000 24.01.2001 04.12.2000 04.12.2000
US 5911994 A	15.06.1999	BR 9801171 A EP 0875250 A1 CN1197664 A JP11012188 A	11.01.2000 04.11.1998 04.11.1998 19.01.1999

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
CIP⁷ A61K 35/78, A61P 15/10, 43/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)
CIP⁷ A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)
CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, HCAPLUS, EMBASE, SCISEARCH

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	EP 0503208 A1 (MARACUYAMA INTERNATIONAL, S.A.) 16.09.1992 página 2, línea 45 - página 3, línea 18	
A	WO 0007587 A1 (EASTERLING, W. J.) 17.02.2000, todo el documento	
A	CORRALES PADILLA, H. et al. "A new agent (Hydrophilic fraction of Polypodium leucotomos) for management of psoriasis". International Journal of Dermatology, 1974. Vol. 13, páginas 276 - 282.	
A	TUOMINEN, M. et al. "Effects of Calaguala and an active principle, Adenosine, on platelet activating factor". Planta Médica, 1992. Vol. 58, páginas 306-310.	
A	BR 9801985 A (RIBEIRO SANTANA, C.A.) 08.02.2000	
A	US 4338300 A (GELBARD) 06.07.1982	
A	US 6022539 A (WEGMAN) 08.02.2000	
A	US 5911994 A (REINHARD et al.) 15.06.1999	

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 11 agosto 2003 (11.08.2003)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

05 SEP 2003

05.09.03

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M

Funcionario autorizado

Asha SUKHWANI

c/ Panarrá 1, 28071 Madrid, España
n° de fax +34 91 3495304

n° de teléfono + 34 91 3495473

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
PCT/ES 03/ 00272

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 0503208 A1	16.09.1992	NINGUNO	
WO 0007587 A1	17.02.2000	US 6031005 A AU 5105599 A NO200100593 A EP 1105113 A1 US2001047037 A1 US 6353028 B2	29.02.2000 28.02.2000 02.04.2001 13.06.2001 29.11.2001 05.03.2002
BR 9801985 A	08.02.2000	NINGUNO	
US 4338300 A	06.07.1982	NINGUNO	
US 6022539 A	08.02.2000	DK200000792 A DE10027521 A1 FR 2794369 A1 AU200035329 A CA 2308842 A1 GB 2352173 A NO200002686 A SE200001914 A	04.12.2000 07.12.2000 08.12.2000 07.12.2000 03.12.2000 24.01.2001 04.12.2000 04.12.2000
US 5911994 A	15.06.1999	BR 9801171 A EP 0875250 A1 CN1197664 A JP11012188 A	11.01.2000 04.11.1998 04.11.1998 19.01.1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.